

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 19 JAN 2004
WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 53 337.7

Anmeldetag: 14. November 2002

Anmelder/Inhaber: november Aktiengesellschaft Gesellschaft
für Molekulare Medizin, Erlangen/DE

Bezeichnung: Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure

IPC: C 12 Q 1/68

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 21. November 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Stech

Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure und einen zur Durchführung des Verfahrens geeigneten Kit.

Ein solches Verfahren ist aus der EP 0 332 435 B2 bekannt. Dabei wird ein im Wesentlichen zu einem diagnostischen Teil einer nachzuweisenden Nukleotidsequenz komplementärer diagnostischer Primer in einer Primerverlängerungsreaktion nur verlängert, wenn das terminale Nukleotid des diagnostischen Primers komplementär zu dem korrespondierenden Nukleotid in dem diagnostischen Teil ist. Das Produkt der Verlängerung dient in einer mit einem Primerpaar durchgeführten Amplifikationsreaktion als Matrize. Das Vorhandensein oder Fehlen der nachzuweisenden Nukleotidsequenz wird durch das Vorhandensein oder das Fehlen eines Amplifikationsprodukts nachgewiesen.

Der Nachweis der Amplifikationsprodukte kann mittels Gelelektrophorese erfolgen. Dazu ist es erforderlich, dass die Amplifikationsprodukte spezifisch durch ihre Länge oder eine spezifische Markierung identifizierbar sind. Deshalb erlaubt das Verfahren bei mehreren parallel durchzuführenden Nachweisreaktionen nur den Nachweis einer sehr begrenzten Zahl unterschiedlicher Amplifikationsprodukte. Ein weiterer Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, dass es, insbesondere bei einer großen Anzahl von Nachweisen, verhältnismäßig aufwändig ist. Als weiteres Nachweisverfahren wird die Präzipitation, beispielsweise radioaktiv, markierter Amplifikationsprodukte angegeben. Dabei können nur so viele Amplifikationsprodukte parallel nachgewiesen werden, wie auf Grund ihrer spezifischen Markierung voneinander unterschieden werden können.

Aus der WO 00/58516 ist ein Verfahren zum parallelen Nachweis von Nukleinsäuren bekannt. Dabei wird eine Lösung, die potenziell nachzuweisende Nukleinsäuren enthält, mit einer Mehrzahl von Primern in Kontakt gebracht. Die Primer besitzen jeweils einen 3'-orientierten für eine nachzuweisende Nukleinsäure spezifischen ersten Abschnitt und einen durch Hybridisierung eindeutig identifizierbaren 5'-orientierten zweiten Abschnitt. Die Primer werden mit den nachzuweisenden Nukleinsäuren unter Bedingungen in Kontakt gebracht, unter denen eine spezifische Hybridisierung stattfinden kann. Hybridisierte Primer werden in einer Verlängerungsreaktion je um ein spezifisch markiertes Nukleotid verlängert. Dadurch kann zwischen nachzuweisenden Nukleinsäuren, die sich im dazu komplementären Nukleotid unterscheiden, differenziert werden. Die Primerverlängerungsprodukte werden mit einer Matrix in Kontakt gebracht, auf deren Oberfläche an definierten Positionen zu den zweiten Abschnitten komplementäre Oligonukleotide immobilisiert sind. Nach Hybridisierung werden die verlängerten Primer spezifisch durch ihre Lokalisation auf der Matrix und ihrer spezifischen Markierung nachgewiesen. Das Verfahren kann zum Nachweis von Nukleinsäuren verwendet werden, welche sich nur in einem Nukleotid unterscheiden. Nachteilig ist, dass das Verfahren nicht sehr empfindlich ist. Weiterhin ist es von Nachteil, dass spezifisch markierte Nukleotide erforderlich sind.

Aus Brownie, J. et al., Nucleic Acids Research, Band 25, Nr. 16 (1997), Seiten 3235 bis 3241 ist ein Verfahren zum Verhindern der Bildung von Primer-Dimeren in einer PCR bekannt. Dabei werden Primer mit einem aus einer zusätzlichen Nukleotidsequenz bestehenden Anhang an ihren 5'-Enden verwendet. Diese Primer sind in einer so niedrigen Konzentration in der PCR vorhanden, dass sie nur an frühen Zyklen der PCR teilnehmen. In weiteren PCR-Zyklen dient ein einzelner die Sequenz des Anhangs aufweisender Primer der Amplifikation. Die Se-

quenz des Anhangs führt bei aus Primer-Dimeren gebildeten Amplifikationsprodukten dazu, dass komplementäre, von der Sequenz des Anhangs abgeleitete Sequenzen eines einzelnen Amplifikationsprodukts miteinander hybridisieren und dabei eine Art "Pfannenstiel"-Struktur bilden. Durch die Hybridisierung wird das Annealing von weiteren Primern an den Anhang verhindert und dadurch die Produktion ungewünschter PCR-Produkte vermieden. Die PCR-Produkte werden gelelektrophoretisch nachgewiesen. Das ist aufwändig und lässt bei parallel in einer PCR durchgeführten Reaktionen nur den Nachweis einer sehr begrenzten Zahl von PCR-Produkten zu.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren und einen Kit zum Nachweis einer Nukleinsäure bereitzustellen, welches/r die Nachteile nach dem Stand der Technik vermeidet. Insbesondere soll das Verfahren mit einfachen Mitteln durchzuführen sein und eine hohe Sensitivität aufweisen. Das Verfahren soll insbesondere den parallelen Nachweis einer großen Zahl verschiedener Nukleotidsequenzen ermöglichen.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 und 32 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 31 und 33 bis 39.

Erfindungsgemäß ist ein Verfahren zum Nachweis mindestens einer Nukleinsäure S mit folgenden Schritten vorgesehen:

a) Bereitstellen eines zusammen mit der Nukleinsäure S zur Durchführung einer PCR geeigneten ersten Primerpaars mit einem ersten und einem zweiten Primer,

wobei der erste Primer einen 5'-endständigen ersten Teilabschnitt sowie einen 3'-endständigen zweiten Teilabschnitt und der zweite Primer einen 5'-endständigen dritten Teilabschnitt und einen 3'-endständigen vierten Teilabschnitt aufweist,

wobei die Sequenzen des zweiten und des vierten Teilabschnitts so ausgewählt sind, dass der zweite Teilabschnitt mit einem vorgegebenen ersten Abschnitt der Nukleinsäure S unter definierten ersten Bedingungen und der vierte Teilabschnitt mit einem vorgegebenen zweiten Abschnitt einer zu der Nukleinsäure S komplementären Nukleinsäure S' unter definierten zweiten Bedingungen spezifisch hybridisieren kann und

wobei ein den ersten mit dem zweiten Teilabschnitt verbindender für den zweiten Teilabschnitt spezifischer Zwischenabschnitt z oder ein den dritten mit dem vierten Teilabschnitt verbindender für den vierten Teilabschnitt spezifischer Zwischenabschnitt z vorgesehen ist,

b) Inkontaktbringen der Nukleinsäure S oder der dazu komplementären Nukleinsäure S' mit dem ersten Primerpaar in einer Lösung und Durchführen einer ersten Primerverlängerungsreaktion, bei welcher der erste Primer unter den ersten Bedingungen oder der zweite Primer unter den zweiten Bedingungen zumindest einmal mindestens so weit verlängert wird, dass der jeweils andere Primer (P2, P1) des ersten Primerpaars unter den für dessen spezifisches Hybridisieren erforderlichen ersten oder zweiten Bedingungen an ein dabei gebildetes erstes Primerverlängerungsprodukt spezifisch binden kann,

c) Durchführen einer zweiten Primerverlängerungsreaktion, bei welcher das erste Primerverlängerungsprodukt als Matrize dient und der zweite oder erste Primer unter den für dessen spezifisches Hybridisieren mit dem ersten Primerverlängerungsprodukt erforderlichen ersten oder zweiten Bedingungen unter Bildung eines zweiten Primerverlängerungsprodukts verlängert wird,

d) Bereitstellen eines zusammen mit dem zweiten Primerverlängerungsprodukt zur Durchführung einer PCR geeigneten zweiten Primerpaars mit einem dritten und einem vierten Primer,

5 wobei die Sequenzen des dritten und vierten Primers so gewählt sind, dass der dritte Primer mit einer zum ersten Teilabschnitt komplementären Sequenz und der vierte Primer mit einer zum dritten Teilabschnitt komplementären Sequenz unter definierten dritten Bedingungen spezifisch hybridisieren
10 kann,

e) Inkontaktbringen des zweiten Primerverlängerungsprodukts mit dem zweiten Primerpaar und Durchführen einer PCR, wobei unter Bildung dritter Primerverlängerungsprodukte der Zwischenabschnitt z oder ein dazu komplementärer Zwischenabschnitt z^T amplifiziert wird,
15

f) Bereitstellen einer immobilisierten Sonde, welche mit dem Zwischenabschnitt z oder dem dazu komplementären Zwischenabschnitt z' unter definierten vierten Bedingungen spezifisch hybridisieren kann,
20

g) Inkontaktbringen der Sonde mit den dritten Primerverlängerungsprodukten unter den vierten Bedingungen,

h) Nachweis der an der Sonde bindenden oder gebundenen dritten Primerverlängerungsprodukte.

Die ersten, zweiten, dritten und vierten Bedingungen umfassen
30 z.B. bestimmte Temperaturen oder Konzentrationen, bspw. eines Primers. Die ersten und die zweiten Bedingungen sind vorzugsweise identisch. Das Durchführen der ersten Primerverlängerungsreaktion gemäß Schritt lit. b und der zweiten Primerverlängerungsreaktion gemäß Schritt lit. c kann gleichzeitig
35 erfolgen. Der erste und der dritte Teilabschnitt sind so ge-

wählt, dass sie unter den ersten oder zweiten Bedingungen jeweils im Wesentlichen nicht mit der Nukleinsäure S oder der dazu komplementären Nukleinsäure S' hybridisieren. Weiterhin sind der erste und der dritte Teilabschnitt vorzugsweise so ausgewählt, dass sie keine das Verfahren störenden Sekundärstrukturen, wie z.B. Haarnadelschleifen, ausbilden und eine ähnliche Schmelztemperatur, eine Länge von 16 bis 28 Nukleotiden, keine Komplementarität zueinander, insbesondere an den 3'-Enden, ein ausgeglichenes GC-Verhältnis und am 3'-Ende keine GC reichen Regionen aufweisen. Auswahlkriterien für die Wahl der Sequenzen sind im Stand der Technik, z.B. aus Michael A. Innis, David H. Gelfand und John J. Sninsky, PCR Applications: Protocols for Functional Genomics, Academic Press, San Diego, CA, USA (1999), bekannt.

Bei einer Ausgestaltung des Verfahrens weisen der erste und der dritte Teilabschnitt dieselbe Länge auf oder unterscheiden sich um höchstens 20% in ihrer Länge. Dadurch kann erreicht werden, dass die spezifischen Annealingtemperaturen des mit der zum ersten Teilabschnitt komplementären Sequenz hybridisierenden dritten Primers und des mit der zum dritten Teilabschnitt komplementären Sequenz hybridisierenden vierten Primers relativ eng beieinander liegen. Je enger die Annealingtemperaturen beieinander liegen, desto effizienter kann die PCR gemäß Schritt lit. e durchgeführt werden.

Bei der Sonde kann es sich um eine Nukleinsäure oder ein Analogon einer Nukleinsäure, wie PNA, handeln. Unter einem Analogon einer Nukleinsäure wird hier jede Struktur verstanden, die spezifisch mit dem Zwischenabschnitt z oder dem dazu komplementären Zwischenabschnitt z' hybridisieren kann. Die Sonde kann z.B. an einer Membran immobilisiert sein. Sie kann auch Bestandteil eines Chips sein. Unter einem Chip wird dabei eine feste, starre Oberfläche verstanden, auf der die Sonde an einer definierten Position immobilisiert ist. Weiter-

re Sonden können jeweils an anderen definierten Positionen auf der Oberfläche immobilisiert sein.

Bei dem Verfahren werden beim Vorhandensein der Nukleinsäure
5 S erste oder zweite Primer verlängert, welche den Zwischenabschnitt z aufweisen. Dass der Zwischenabschnitt z für den zweiten oder vierten Teilabschnitt spezifisch ist, bedeutet, dass ein bestimmter Zwischenabschnitt z eindeutig einem bestimmten zweiten oder vierten Teilabschnitt zugeordnet werden
10 kann. Der Zwischenabschnitt z oder der dazu komplementäre Zwischenabschnitt z' wird mittels dritter und vierter Primer spezifisch amplifiziert. Durch Hybridisierung des Zwischenabschnitts z oder des dazu komplementären Zwischenabschnitts z' mit der Sonde beim Schritt lit. g werden Verlängerungsprodukte
15 der dritten oder vierten Primer spezifisch an der Sonde gebunden und können dort beim oder nach dem Binden nachgewiesen werden.

Der besondere Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, dass durch den Zwischenabschnitt z eine nahezu
20 unbegrenzt große Zahl an spezifischen Kennzeichnungen für Primer zur Verfügung gestellt werden kann. Dadurch ist ein paralleler spezifischer Nachweis einer großen Zahl von Nukleinsäuren möglich. Durch das durch die PCR im Schritt lit. e erreichte exponentielle Amplifizieren des Zwischenabschnitts z oder des dazu komplementären Zwischenabschnitts z' wird eine hohe Sensitivität erreicht.

Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die erste und zweite
30 Primerverlängerungsreaktion nur einmal oder wenige Male durchgeführt werden muss. Weil dabei auf eine exponentielle Amplifikation verzichtet werden kann wirkt sich bei parallel durchgeführten Nachweisreaktionen eine unterschiedliche Effizienz der ersten und zweiten Primerverlängerungsreaktion nur

geringfügig auf die Menge der dritten Primerverlängerungsprodukte aus.

- Ein paralleler Nachweis einer Mehrzahl von Nukleinsäuren kann bisher mittels einer parallelen Amplifikation dieser Nukleinsäuren in einem PCR-Ansatz, einer so genannten Multiplex-PCR, erfolgen. Dabei kann es wegen der erforderlichen hohen Gesamtkonzentration an Primern zur Bildung von Primerdimeren und dadurch zu einer Inhibition der gewünschten PCR-Reaktionen kommen. Ein paralleler Nachweis einer Mehrzahl von Nukleinsäuren mittels Multiplex-PCR ist daher bisher auf den Nachweis weniger Nukleinsäuren mit wenigen Primerpaaren beschränkt. Beim parallelen Nachweis einer Mehrzahl unterschiedlicher Nukleinsäuren S mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es deshalb besonders vorteilhaft, dass das jeweils erste Primerpaar in so geringer Konzentration bereitgestellt werden kann, dass durch die Konzentration der ersten Primerpaare keine Störungen verursacht werden.
- Bei einem parallelen Nachweis einer Mehrzahl von Nukleinsäuren mittels Multiplex-PCR werden die Nukleinsäuren bisher üblicherweise ungleichmäßig stark amplifiziert. Der Grund dafür ist, dass sich wegen der exponentiellen Vermehrung in der PCR schon kleine Unterschiede in der Effizienz der verschiedenen Primer stark auf die Menge der gebildeten Produkte auswirken. Diese kleinen Unterschiede sind bei einer Multiplex-PCR aber, bedingt durch die Sequenzen der nachzuweisenden Nukleinsäuren, nahezu zwangsläufig vorhanden. Es werden spezifische Primer unterschiedlicher Sequenz und häufig auch unterschiedlicher Länge eingesetzt. Dieser Nachteil kann durch die vorliegende Erfindung dadurch überwunden werden, dass das zweite Primerpaar unabhängig von der Sequenz der nachzuweisenden Nukleinsäure S gestaltet werden kann. Dadurch können zweite Primerpaare mit einheitlicher Effizienz bei der PCR bereitgestellt werden. Beispielsweise können alle ersten Primerpaare

einen ersten Primer mit einem einheitlichen ersten Teilabschnitt und einen zweiten Primer mit einem einheitlichen dritten Teilabschnitt aufweisen. Damit liegen zwei für alle nachzuweisenden unterschiedlichen Nukleinsäuren S gleiche universelle Primerbindungsstellen vor. Dadurch ist es möglich, beim Schritt lit. d für alle nachzuweisenden Nukleinsäuren S ein gemeinsames zweites Primerpaar bereitzustellen und damit beim Schritt lit. e eine PCR durchzuführen.

- 10 Beim parallelen Nachweis mehrerer unterschiedlicher Nukleinsäuren S besteht ein weiterer Vorteil des Verfahrens darin, dass die Primer so gestaltet werden können, dass die Nachweise unter einheitlichen Bedingungen durchgeführt werden können. Weiterhin ist es vorteilhaft, dass einmal ermittelte Bedingungen für das Hybridisieren des Zwischenabschnitts z oder des dazu komplementären Zwischenabschnitts z' mit der Sonde für verschiedene Nachweisreaktionen verwendet werden können. Dazu kann der Zwischenabschnitt z in unterschiedlichen ersten oder zweiten Primern mit unterschiedlichen zweiten oder vier-
- 15 ten Teilabschnitten kombiniert sein. Dadurch kann z.B. ein verschiedene immobilisierte Sonden aufweisender Chip bereitgestellt werden. Der Chip kann mit den Sequenzen der Sonden und der Zwischenabschnitte z für das erfinderische Verfahren optimiert und zum Nachweis unterschiedlicher Nukleinsäuren S genutzt werden.

- Vorzugsweise werden die erste und zweite Primerverlängerungsreaktion als PCR durchgeführt. Dadurch können diese Primerverlängerungsreaktionen mit Enzymen und Nukleotiden durchgeführt werden, die für die Durchführung der PCR im Schritt lit. e erforderlich sind. Das Verfahren wird dadurch vereinfacht, denn es müssen nur einmal Enzyme und Nukleotide zugesetzt werden.

Es hat sich weiterhin als vorteilhaft erwiesen, wenn die erste und/oder zweite Primerverlängerungsreaktion und/oder PCR unter so genannten Heißstartbedingungen durchgeführt wird. Dabei wird die Temperatur des Reaktionsansatzes erhöht und
5 sichergestellt, dass eine eingesetzte DNA-Polymerase erst dann die ersten, zweiten, dritten und/oder vierten Primer verlängert, wenn die Temperatur im Reaktionsansatz mindestens die für ein spezifisches Annealing dieser Primer erforderliche Temperatur erreicht hat. Das kann z.B. dadurch sichergestellt werden, dass für die erste und/oder zweite Primerverlängerungsreaktion und/oder PCR die DNA-Polymerase dem jeweiligen Reaktionsansatz erst nach Erreichen dieser Temperatur
10 zugesetzt wird oder indem eine Polymerase verwendet wird, die erst durch Erhitzen aktiviert wird. Dadurch wird vermieden, das unspezifisch bindende erste, zweite, dritte oder vierte
15 Primer verlängert werden.

Bei einer vorteilhaften Ausgestaltung des Verfahrens wird die erste und/oder zweite Primerverlängerungsreaktion höchstens
20 10 mal, vorzugsweise höchstens 5 mal, insbesondere höchstens 2 mal, durchgeführt. Eine niedrige Anzahl erster Primerverlängerungsreaktionen bewirkt, dass es sich bei einer Mehrzahl von parallel in einem Reaktionsansatz durchgeführten Nachweisreaktionen kaum auf die Menge der gebildeten dritten Primerverlängerungsprodukte auswirkt, wenn die ersten und/oder zweiten Primerverlängerungsreaktionen mit unterschiedlicher Effizienz ablaufen.

Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, wenn die Sequenzen des ersten und dritten Teilabschnitts so gewählt
30 sind, dass die dritten Bedingungen so stringent sein können, dass der zweite Teilabschnitt mit dem ersten Abschnitt der Nukleinsäure S und der vierte Teilabschnitt mit dem zweiten Abschnitt der zu der Nukleinsäure S komplementären Nukleinsäure S' unter den dritten Bedingungen im Wesentlichen nicht
35

hybridisiert. Das ermöglicht es, die Reaktion in einem Ansatz durchzuführen, der von vorne herein die ersten, zweiten, dritten und vierten Primer enthält. Durch bloßes Erhöhen der Stringenz, z.B. durch Temperaturerhöhung, lässt sich dann die

5 erste und zweite Primerverlängerungsreaktion beenden und es findet nur noch eine Verlängerung der dritten und vierten Primer bei der PCR statt, obwohl die ersten und zweiten Primer weiterhin im Ansatz enthalten sind.

- 10 Bei einer Ausgestaltung des Verfahrens sind die Sequenzen und Konzentrationen des ersten, zweiten, dritten und vierten Primers so gewählt, dass die spezifische Annealingtemperatur des mit der zum ersten Teilabschnitt komplementären Sequenz hybridisierenden dritten Primers und des mit der zum dritten
- 15 Teilabschnitt komplementären Sequenz hybridisierenden vierten Primers jeweils zumindest um 5 °C höher ist als die jeweils höhere Annealingtemperatur des mit dem ersten Abschnitt der Nukleinsäure S hybridisierenden zweiten Teilabschnitts und des mit dem zweiten Abschnitt der komplementären Nukleinsäure
- 20 S' hybridisierenden vierten Teilabschnitts. Dadurch, dass die Annealingtemperaturen zumindest um 5 °C auseinander liegen, kann durch eine Erhöhung der Stringenz, z.B. durch eine Erhöhung der Temperatur, sicher vermieden werden, dass die erste oder zweite Primerverlängerungsreaktion beim Durchführen der PCR gemäß lit. e stattfindet.

- Der Schritt lit. e kann in der Lösung durchgeführt werden. Es ist nicht erforderlich die ersten Primerverlängerungsprodukte aus der Lösung zu entfernen und in eine weitere Lösung zu
- 30 überführen. Vorzugsweise werden zumindest die Schritte lit. a bis lit. e, insbesondere die Schritte lit. a bis lit. h in einem verschlossenen Gefäß durchgeführt, welches zwischen den Schritten nicht geöffnet wird. Dadurch können das Ergebnis verfälschende Kontaminationen vermieden werden. Weiterhin

vereinfacht die Nutzung eines geschlossenen Gefäßes die Handhabung und Automation des Verfahrens.

Bei einer vorteilhaften Ausgestaltung des Verfahrens wird die
5 Konzentration des den Zwischenabschnitt z₁ enthaltenden ersten
oder zweiten Primers in der Lösung so niedrig gewählt, dass
durch diesen Primer ein Hybridisieren der Sonde mit dem Zwischenabschnitt z₁ oder des dazu komplementären Zwischenabschnitts z₂ beim Schritt lit. g nicht wesentlich inhibiert
10 wird. Nicht wesentlich inhibiert bedeutet, dass das Hybridisieren beim Schritt lit. g in einem für den Nachweis beim Schritt lit. h ausreichenden Ausmaß stattfindet. Durch die genannten Merkmale kann weit gehend verhindert werden, dass ein solcher Primer beim Schritt lit. g mit den Verlängerungs-
15 produkten der dritten oder vierten Primer um die Bindung an der Sonde konkurriert. Es kann auch weit gehend verhindert werden, dass die Hybridisierung der Sonde mit dem zum Zwischenabschnitt z₁ komplementären Zwischenabschnitt z₂ durch ein Hybridisieren des Zwischenabschnitts z₂ mit diesem Primer
20 inhibiert wird. Dadurch wird das Verfahren wesentlich vereinfacht. Ein Entfernen eines Überschusses von den Zwischenabschnitt z₁ enthaltenden ersten oder zweiten Primern ist nicht erforderlich. Durch die niedrige Konzentration kann im Wesentlichen auch verhindert werden, dass durch eine Hybridisierung einer der genannten Primer mit der Sonde ein eigentlich dem Nachweis dienendes Signal ausgelöst wird. Durch eine niedrige Konzentration des ersten Primerpaares kann außerdem
30 die Bildung von Dimeren aus ersten und zweiten Primern verhindert werden. Sie ermöglicht beim Nachweis mehrerer Nukleinsäuren S den Einsatz einer Vielzahl unterschiedlicher erster Primerpaare, ohne in der Gesamtkonzentration dieser Primerpaare den für Primerverlängerungsreaktionen günstigen Konzentrationsbereich für Primer zu überschreiten.

Vorzugsweise wird die Konzentration des ersten Primerpaars in der Lösung auf 0,001 bis 0,1 $\mu\text{mol/l}$ eingestellt. Vorteilhaft ist es, wenn das Verhältnis der Konzentrationen von erstem Primerpaar zu zweitem Primerpaar kleiner als 1:10, vorzugsweise kleiner als 1:100, besonders vorzugsweise kleiner als 1:1000, ist. Je kleiner das Verhältnis ist, desto weniger konkurriert der Zwischenabschnitt z des ersten oder zweiten Primers mit den Verlängerungsprodukten der dritten oder vierten Primer um die Bindung an der Sonde oder mit der Sonde um die Bindung an dem zum Zwischenabschnitt z komplementären Zwischenabschnitt z'.

Das zweite Primerpaar kann der Lösung vor der ersten Primerverlängerungsreaktion zugesetzt werden. Das Verfahren wird dadurch vereinfacht. Zwischen der ersten und der zweiten Primerverlängerungsreaktion sind dadurch keine Pipettierschritte erforderlich. Das Durchführen der ersten oder zweiten Primerverlängerungsreaktion kann ausschließlich über Temperatur gesteuert werden.

Vorzugsweise wird beim Schritt lit. e der dritte oder der vierte Primer häufiger verlängert als der jeweils andere Primer des zweiten Primerpaars. Das kann z.B. erreicht werden, indem in dem beim Schritt lit. d bereitgestellten zweiten Primerpaar der dritte oder vierte Primer gegenüber dem jeweils anderen darin enthaltenen Primer in einem, vorzugsweise 2- bis 5-fachen, Überschuss vorliegt. Unter diesen asymmetrischen Bedingungen kann gezielt das an die Sonde bindende Verlängerungsprodukt gegenüber dem anderen Verlängerungsprodukt des dritten oder vierten Primers im Überschuss gebildet werden. Dadurch kann eine mit der Hybridisierung mit der Sonde konkurrierende Hybridisierung der Verlängerungsprodukte der dritten und vierten Primer untereinander deutlich vermindert werden, so dass ein größerer Anteil der dritten Primerverlängerungsprodukte an die Sonde bindet. Das kann die Sensitivi-

tät des Nachweises verbessern bzw. ein stärkeres Signal beim Nachweis ermöglichen. Weiterhin ist das Verfahren dadurch effizienter und wirtschaftlicher, weil nur eines der beiden gebildeten dritten Primerverlängerungsprodukte zum Nachweis benötigt wird.

Der Lösung kann zum Nachweis unterschiedlicher Nukleinsäuren S eine Mehrzahl erster Primerpaare zugesetzt werden, deren erste oder zweite Primer sich jeweils im Zwischenabschnitt z und im sich daran anschließend angeordneten zweiten oder vierten Teilabschnitt unterscheiden, wobei jeder der zweiten oder vierten Teilabschnitte spezifisch für genau einer der Nukleinsäuren S ist. Dadurch, dass jeder Zwischenabschnitt z genau einem zweiten oder vierten Teilabschnitt zugeordnet werden kann und jeder zweite oder vierte Teilabschnitt spezifisch für genau eine der Nukleinsäuren S ist, ist eine Zuordnung jedes Zwischenabschnitts z bzw. jedes dazu komplementären Zwischenabschnitts z' zu einer der Nukleinsäuren S möglich. Durch den spezifischen Nachweis von den Zwischenabschnitt z oder den Zwischenabschnitt z' enthaltenden Primerverlängerungsprodukten kann bestimmt werden, ob in der Lösung mit den zweiten oder vierten Teilabschnitten spezifisch hybridisierende Nukleinsäuren S vorhanden sind.

Zum Nachweis unterschiedlicher Nukleinsäuren S kann der Lösung eine Mehrzahl erster Primerpaare zugesetzt werden, deren erste Primer einen jeweils identischen oder nahezu identischen ersten Teilabschnitt und/oder deren zweite Primer einen jeweils identischen oder nahezu identischen dritten Teilabschnitt aufweisen und deren zweiter oder vierter Teilabschnitt jeweils spezifisch für genau eine der Nukleinsäuren S ist. Teilabschnitte sind nahezu identisch, wenn die gleichen Primer damit hybridisieren können. Dadurch ist es möglich, jeweils alle dritten und jeweils alle vierten Primer einheitlich zu gestalten, so dass nur ein zweites Primerpaar erforder-

derlich ist. Dadurch wird das Verfahren erheblich vereinfacht.

Weiterhin kann das Verfahren dadurch vereinfacht werden, dass die ersten und dritten Teilabschnitte identisch oder nahezu identisch sind und der dritte Primer identisch mit dem vierten Primer ist. Dadurch kann die PCR gemäß Schritt lit. e auch beim Nachweis einer Mehrzahl von Nukleinsäuren S mit nur einer einzigen Art von Primern durchgeführt werden.

Die Sequenzen der ersten, zweiten, dritten und vierten Primer können so gewählt sein, dass sie bei dem Verfahren keine Primer-Dimere bilden und/oder nicht mit sich selbst oder untereinander hybridisieren. Die Ausbildung von Primer-Dimeren führt bei der PCR zu einer verminderten Produktion des gewünschten Produkts, z.B. der dritten Primerverlängerungsprodukte. Möglichkeiten die Bildung von Primer-Dimeren zu unterdrücken sind aus Brownie, J. et al., Nucleic Acids Research, Band 25, Nr. 16 (1997), Seiten 3235 bis 3241 bekannt. Weiterhin sollen weder erste mit zweiten oder dritte mit vierten Primern noch erste mit ersten, zweite mit zweiten, dritte mit dritten oder vierte mit vierten Primern oder sonstige Primer unter den Bedingungen des Verfahrens miteinander hybridisieren können. Das erhöht die Effizienz des Verfahrens. Weiterhin ist es zur Effizienzsteigerung vorteilhaft, wenn die Sequenzen der Zwischenabschnitte z so gewählt sind, dass sie weder selbst noch die dazu komplementären Zwischenabschnitte z' bei dem Verfahren mit sich selbst oder mit den ersten, zweiten, dritten oder vierten Teilabschnitten oder deren komplementären Sequenzen hybridisieren.

Das Verfahren ist auch geeignet, die eine erste Base aufweisende Nukleinsäure S in Gegenwart einer sich von der Nukleinsäure S nur in der ersten Base unterscheidenden weiteren Nukleinsäure spezifisch nachzuweisen. Die Nukleinsäure S und

die weitere Nukleinsäure können beispielsweise polymorphe Nukleinsäuren sein. Dabei ist es vorteilhaft, wenn die Sequenzen der ersten oder zweiten Primer so gewählt sind, dass sich die jeweilige Base des zweiten oder vierten Teilabschnitts, die zu der ersten Base oder einer dazu komplementären zweiten Base einer komplementären Nukleinsäure S' komplementär ist, am 3'-Ende oder in der Nähe des 3'-Endes des ersten oder zweiten Primers befindet. In der Nähe bedeutet dabei insbesondere, dass sich zwischen der jeweiligen Base und dem Ende höchstens 3 Nukleotide befinden. Die ersten oder zweiten Bedingungen der ersten oder zweiten Primerverlängerungsreaktion können dabei so gewählt werden, dass ein Primer, der eine Base aufweist, die nicht komplementär ist, bei der ersten oder zweiten Primerverlängerungsreaktion nicht verlängert wird.

Die Spezifität des Verfahrens kann weiter erhöht werden, indem die zweiten oder vierten Teilabschnitte eine Base enthalten, welche nicht zu einer ihr in der Position entsprechenden dritten Base im ersten Abschnitt der Nukleinsäure S oder im zweiten Abschnitt der zu der Nukleinsäure S komplementären Nukleinsäure S' komplementär ist. Eine Base im zweiten oder vierten Teilabschnitt entspricht in der Position der dritten Base, wenn die dritte Base ihr beim Hybridisieren des zweiten oder vierten Teilabschnitts mit dem ersten oder zweiten Abschnitt gegenüberliegend positioniert wäre. Durch die nicht komplementäre Base in den zweiten oder vierten Teilabschnitten wird erreicht, dass beim Nachweis polymorpher Nukleinsäuren im Falle einer Hybridisierung mit einer nicht spezifischen weiteren Nukleinsäure zwei Fehlpaarungen vorliegen, während bei der Hybridisierung mit der spezifischen Nukleinsäure S nur eine Fehlpaarung vorliegt. Unter einer Fehlpaarung wird eine Paarung nicht komplementärer Basen verstanden. Häufig wird ein hybridisierter Primer, der nur einfach fehlgepaart ist, dennoch verlängert, während ein zweifach fehlge-

paarter Primer nicht verlängert wird, insbesondere weil ein zwei Fehlpaarungen aufweisendes Hybrid relativ instabil ist.

5 Zum Nachweis unterschiedlicher Nukleinsäuren S können die jeweiligen Sequenzen der ersten, zweiten, dritten und vierten Primer und der Sonde so gewählt sein, dass jeweils die ersten, jeweils die zweiten, jeweils die dritten und/oder jeweils die vierten Bedingungen für den Nachweis der unterschiedlichen Nukleinsäuren S identisch sind. Wenn jeweils alle
10 le ersten, jeweils alle zweiten, jeweils alle dritten und jeweils alle vierten Bedingungen identisch sind wird ein paralleler Nachweis der unterschiedlichen Nukleinsäuren S in einem Reaktionsansatz ermöglicht. Die Sequenzen sollten so gewählt werden, dass unter den genannten Bedingungen spezifische Hybridisierungen ohne Kreuzhybridisierungen erfolgen.
15

Besonders effizient kann das Verfahren gestaltet werden, wenn die Sonde an einer Elektrode oder in deren unmittelbarer Nähe immobilisiert ist. Der Nachweis beim Schritt lit. h kann dann
20 durch Erfassen einer durch das Hybridisieren bedingten Änderung einer elektrischen Eigenschaft an der Elektrode erfolgen. In unmittelbarer Nähe bedeutet dabei, dass die Sonde so nah an der Elektrode immobilisiert ist, dass Hybridisierungen mit der Sonde an der Elektrode noch elektrisch erfasst und der Sonde zugeordnet werden können. Die Elektrode kann aber auch dazu dienen, die dritten Primerverlängerungsprodukte durch elektrostatische Anziehung an der Sonde anzureichern. In unmittelbarer Nähe bedeutet dann, dass die Sonde so im Verhältnis zu der Elektrode angeordnet ist, dass ein solches
30 Anreichern möglich ist. Weiterhin kann die Elektrode auch dazu dienen, durch elektrostatische Abstoßung unspezifisch gebundene dritte Primerverlängerungsprodukte von der Sonde zu entfernen. Der Nachweis beim Schritt lit. h kann auch durch Erfassen einer durch das Hybridisieren bedingten Änderung einer fluoreszenzoptischen Eigenschaft erfolgen.
35

Bei der Änderung der elektrischen Eigenschaft kann es sich um eine Änderung einer Redox-Eigenschaft, insbesondere bei der Oxidation von Guanin- oder Adenin-Resten des dritten Primerverlängerungsprodukts, einer Impedanz oder einer Leitfähigkeit handeln, welche über die jeweilige Elektrode gemessen wird. Die Redox-Eigenschaft kann ein Redox-Potenzial sein, dessen Änderung durch elektrochemische Umsetzung des an der Sonde gebundenen dritten Primerverlängerungsprodukts, z.B. durch Differenzielle Puls-Voltammetrie oder Chronopotentiometrische Stripping-Analyse, erfasst wird. Beispielsweise kann die Bindung des dritten Primerverlängerungsprodukts an der Sonde durch Oxidation von dessen Guanin- und/oder Adenin-Resten elektrochemisch nachgewiesen werden. Als Elektrode kann eine Kohlenstoff enthaltende Elektrode oder eine Metall-Elektrode, insbesondere eine Gold-Elektrode, verwendet werden.

Der dritte und/oder vierte Primer kann einen an der Elektrode fluoreszenzoptisch oder mittels der Elektrode elektrisch oder elektrochemisch nachweisbaren, vorzugsweise redoxaktiven, Marker aufweisen. Der Marker kann direkt oder indirekt nachweisbar sein. Indirekt ist z.B. ein Marker nachweisbar, welcher ein spezifisches Affinitätsmolekül aufweist. Ein spezifisches Affinitätsmolekül ist ein Molekül, an das mit hoher Spezifität und Affinität ein Gegenmolekül bindet. Das Affinitätsmolekül kann z.B. Biotin oder ein Hapten und das entsprechende Gegenmolekül Streptavidin oder ein Antikörper sein. Das Gegenmolekül kann z.B. mit einem Fluoreszenzfarbstoff, einem redoxaktiven Molekül oder einem Enzym konjugiert sein. Bei dem Enzym kann es sich um ein Enzym handeln, welches ein Substrat so umsetzen kann, dass das Reaktionsprodukt elektrochemisch oder optisch spezifisch nachgewiesen werden kann. Das Enzym kann z.B. eine Phosphatase sein, welche durch die enzymatische Umsetzung von Naphthylphosphat elektrochemisch

nachgewiesen werden kann. Ist der Marker direkt nachzuweisen, kann er einen Osmium-Komplex, ein Nanogold-Partikel, eine Cystein-, Ferrocenyl-, Daunomyzin-, Benzochinon-, Naphthochinon-, Anthrachinon- oder p-Aminophenol-Gruppe, einen Farbstoff, insbesondere Indophenol, Thiazin oder Phenazin, oder einen Fluoreszenzfarbstoff, insbesondere 6-FAM, HEX, TET, Cy3, Cy5, IRDye[™]700, IRDye[™]800, Biodipy, Fluorescein, Joe, Rox, TAMRA oder Texas Red, aufweisen. Mit den genannten Fluoreszenzfarbstoffen markierte Oligonukleotide können von der Firma Thermo Hybaid, Sedanstrasse 18, D-89077 Ulm, Deutschland bezogen werden.

Der Marker kann auch ein Enzym sein, welches ein Substrat so umsetzen kann, dass das Reaktionsprodukt elektrochemisch oder optisch spezifisch nachgewiesen werden kann.

Vorzugsweise wird zum Nachweis unterschiedlicher Nukleinsäuren S eine Vielzahl unterschiedlicher zu den Zwischenabschnitten z oder den dazu komplementären Zwischenabschnitten z' komplementärer Sonden verwendet, von denen jede an oder in unmittelbarer Nähe einer separaten Elektrode gebunden ist, so dass von einem Signal an einer spezifischen Elektrode auf das Vorhandensein einer spezifischen Nukleinsäure S geschlossen werden kann. Zum Nachweis unterschiedlicher Nukleinsäuren S kann eine Vielzahl einzeln kontaktierter oder kontaktierbarer auf einer Oberfläche, insbesondere einem Elektrodenchip, angeordneter Elektroden verwendet werden. Unter einem Elektrodenchip wird hier eine nicht notwendigerweise aus Halbleitermaterial bestehende kleine Platte mit elektronischen Mikrostrukturen verstanden. Je kleiner die Oberfläche ist, desto geringer ist das für den Nachweis erforderliche Volumen der Lösung.

Eine RNA kann indirekt dadurch nachgewiesen werden, dass sie in eine DNA umgeschrieben und die DNA dann als Nukleinsäure S

nachgewiesen wird. Das Umschreiben kann mittels des Enzyms "Reverse Transkriptase" erfolgen.

Weiterhin betrifft die Erfindung einen Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche zum parallelen Nachweis einer Mehrzahl unterschiedlicher Nukleinsäuren S enthaltend:

a) für jede nachzuweisende Nukleinsäure S je ein zusammen mit der Nukleinsäure S zur Durchführung einer PCR geeignetes erstes Primerpaar mit einem ersten und einem zweiten Primer,

wobei der erste Primer einen 5'-endständigen ersten Teilabschnitt sowie einen 3'-endständigen zweiten Teilabschnitt und der zweite Primer einen 5'-endständigen dritten Teilabschnitt und einen 3'-endständigen vierten Teilabschnitt aufweist,

wobei die Sequenzen des zweiten und des vierten Teilabschnitts so ausgewählt sind, dass der zweite Teilabschnitt mit einem vorgegebenen ersten Abschnitt der jeweils nachzuweisenden Nukleinsäure S unter definierten ersten Bedingungen und der vierte Teilabschnitt mit einem vorgegebenen zweiten Abschnitt einer zu der jeweils nachzuweisenden Nukleinsäure S komplementären Nukleinsäure S' unter definierten zweiten Bedingungen spezifisch hybridisieren kann und

wobei ein den ersten mit dem zweiten Teilabschnitt verbindender für den zweiten Teilabschnitt spezifischer Zwischenabschnitt z oder ein den dritten mit dem vierten Teilabschnitt verbindender für den vierten Teilabschnitt spezifischer Zwischenabschnitt z vorgesehen ist und

b) für jede nachzuweisende Nukleinsäure S je ein zweites Primerpaar mit einem dritten und einem vierten Primer, welches zusammen mit einem bei Anwesenheit der jeweils nachzu-

weisenden Nukleinsäure S mittels des ersten und zweiten Primers erzeugbaren Primerverlängerungsprodukt zur Durchführung einer PCR geeignet ist und

- 5 wobei die Sequenzen des dritten und vierten Primers so gewählt sind, dass der dritte Primer mit einer zu den ersten Teilabschnitten der ersten Primer komplementären Sequenz und der vierte Primer mit einer zu den dritten Teilabschnitten der zweiten Primer komplementären Sequenz unter definierten
10 dritten Bedingungen spezifisch hybridisieren kann.

- In dem Kit kann für jede nachzuweisende Nukleinsäure S je eine Sonde enthalten sein, welche jeweils mit dem Zwischenabschnitt z oder dem dazu komplementären Zwischenabschnitt z' unter definierten vierten Bedingungen spezifisch hybridisieren kann. Die Sonden können, insbesondere in einer spezifischen Anordnung, beispielsweise auf einem Chip, immobilisiert sein.

- 15 20 Vorzugsweise sind die ersten Teilabschnitte der in dem Kit enthaltenen ersten Primer und/oder die dritten Teilabschnitte der in dem Kit enthaltenen zweiten Primer gleich. Das ermöglicht es, für alle nachzuweisenden Nukleinsäuren S einheitliche dritte und/oder vierte Primer zu verwenden.

- Die Sequenzen der Zwischenabschnitte z sind vorzugsweise so gewählt, dass die vierten Bedingungen für alle Zwischenabschnitte z oder die dazu komplementären Zwischenabschnitte z' identisch sind. Das ermöglicht es, dass alle Zwischenabschnitte z oder dazu komplementäre Zwischenabschnitte z' der
30 dritten Primerverlängerungsprodukte gleichzeitig an die jeweilige Sonde binden können. Die Auswahl der Sequenzen ermöglicht eine vereinfachte und beschleunigte Durchführung des Verfahrens.

35

Der Kit kann weiterhin eine Anordnung von Elektroden enthalten, wobei an oder in unmittelbarer Nähe jeder Elektrode der Anordnung jeweils eine Sonde immobilisiert ist. Dabei sind die Sonden so immobilisiert, dass eine eindeutige Zuordnung jeder Elektrode zu einer Sonde möglich ist. Die Anordnung von Elektroden kann aus Elektroden bestehen, welche auf einer Oberfläche angeordnet sind. Die Anordnung von Elektroden kann ein Elektrodenchip sein.

- 10 Statt des ersten Primerpaars können in dem Kit Angaben der Sequenzen des ersten Teilabschnitts, des dritten Teilabschnitts und des Zwischenabschnitts z oder der dazu jeweils komplementären Sequenzen enthalten sein. Mittels dieser Angaben kann der Anwender des Kits das erste Primerpaar für beliebige nachzuweisende Nukleinsäuren S selbst herstellen oder herstellen lassen.

Nachfolgend werden Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung näher erläutert. Hierbei zeigen:

- 20 Fig. 1 eine schematische Darstellung eines ersten (P1) und eines zweiten Primers (P2),
- Fig. 2 eine schematische Darstellung einer ersten und zweiten Primerverlängerungsreaktion,
- Fig. 3 eine schematische Darstellung einer PCR und
- 30 Fig. 4 eine schematische Darstellung eines mit einer immobilisierten Sonde hybridisierten Primerverlängerungsprodukts.

Der in Fig. 1 dargestellte erste Primer P1 besteht aus einem 5'-endständigen ersten Teilabschnitt t1 und einem 3'-endständigen zweiten Teilabschnitt t2. Der zweite Primer P2 besteht

aus einem 5'-endständigen dritten Teilabschnitt t3 und einem 3'-endständigen vierten Teilabschnitt t4. Zwischen dem dritten t3 und dem vierten Teilabschnitt t4 befindet sich der Zwischenabschnitt z. Der zweite Teilabschnitt t2 ist zu einem vorgegebenen ersten Abschnitt in einer nachzuweisenden Nukleinsäure S komplementär. Der vierte Teilabschnitt t4 ist zu einem vorgegebenen zweiten Abschnitt der zur nachzuweisenden Nukleinsäure S komplementären Nukleinsäure S' komplementär. Der erste t1 und der dritte Teilabschnitt t3 sind bevorzugt weder zu einem Abschnitt der Nukleinsäure S noch zu der dazu komplementären Nukleinsäure S' komplementär.

In den oberen beiden Abbildungen der Fig. 2 sind erste Primerverlängerungsreaktionen dargestellt. Zunächst wird dazu die mit der Nukleinsäure S' doppelsträngig vorliegende Nukleinsäure S, z.B. durch eine Temperaturerhöhung, denaturiert, d.h. einzelsträngig gemacht. Dann hybridisiert der zweite Teilabschnitt t2 mit dem ersten Abschnitt der nachzuweisenden Nukleinsäure S und der vierte Teilabschnitt t4 mit dem zweiten Abschnitt der zur Nukleinsäure S komplementären Nukleinsäure S'. Bei der ersten Primerverlängerungsreaktion werden der erste P1 und der zweite Primer P2 jeweils zumindest so weit verlängert, dass der jeweils andere Primer P2 oder P1 an einem dabei gebildeten ersten Primerverlängerungsprodukt binden kann. Bei einer anschließend durchgeführten in den unteren beiden Abbildungen der Fig. 2 dargestellten zweiten Primerverlängerungsreaktion dient das jeweils erste Primerverlängerungsprodukt als Matrize. Es werden zweite Primerverlängerungsprodukte gebildet, welche jeweils eine zum ersten P1 und zweiten Primer P2 komplementäre Sequenz aufweisen. Das Verfahren kann auch mit einer nachzuweisenden Nukleinsäure S durchgeführt werden, welche anfänglich ohne die dazu komplementäre Nukleinsäure S' vorliegt. Der zweite Primer P2 könnte dann erst mit dem ersten Primerverlängerungs-

produkt anstatt mit der komplementären Nukleinsäure S' hybridisieren.

Die obere Abbildung der Fig. 3 zeigt aus der Verlängerung der ersten P1 und der zweiten Primer P2 entstandene zweite Primerverlängerungsprodukte. Mit deren 5'-Enden hybridisiert jeweils ein dritter P3 und ein mit einer Markierungssubstanz bzw. einem Marker versehener vierter Primer P4. Durch eine PCR entsteht eine große Anzahl dritter Primerverlängerungsprodukte der dritten P3 und vierten Primer P4. Das ist in der unteren Abbildung der Fig. 3 schematisch dargestellt. Bei der PCR wird der Zwischenabschnitt z' bzw. ein dazu komplementärer Zwischenabschnitt z' vervielfältigt.

In Fig. 4 ist das Hybridisieren eines zum Zwischenabschnitt z komplementären Zwischenabschnitts z' mit einer dazu komplementären Sequenz einer an einer Elektrode E immobilisierten Sonde So dargestellt. Durch das Hybridisieren wird der Marker M so in die Nähe der Elektrode E gebracht, dass er dort durch eine Änderung einer elektrischen Eigenschaft nachgewiesen werden kann. Bei dem Marker M kann es sich um eine redoxaktive Substanz, wie beispielsweise Osmiumtetroxyd, handeln, welche an der Elektrode reduziert bzw. oxidiert werden kann. Das über die Elektrode E messbare Redoxsignal des Markers M zeigt somit das ursprüngliche Vorhandensein der Nukleinsäure S an.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis mindestens einer Nukleinsäure S mit folgenden Schritten:

5

a) Bereitstellen eines zusammen mit der Nukleinsäure S zur Durchführung einer PCR geeigneten ersten Primerpaars mit einem ersten (P1) und einem zweiten Primer (P2),

10

wobei der erste Primer (P1) einen 5'-endständigen ersten Teilabschnitt (t1) sowie einen 3'-endständigen zweiten Teilabschnitt (t2) und der zweite Primer (P2) einen 5'-endständigen dritten Teilabschnitt (t3) und einen 3'-endständigen vierten Teilabschnitt (t4) aufweist,

15

wobei die Sequenzen des zweiten (t2) und des vierten Teilabschnitts (t4) so ausgewählt sind, dass der zweite Teilabschnitt (t2) mit einem vorgegebenen ersten Abschnitt der Nukleinsäure S unter definierten ersten Bedingungen und der vierte Teilabschnitt (t4) mit einem vorgegebenen zweiten Abschnitt einer zu der Nukleinsäure S komplementären Nukleinsäure S' unter definierten zweiten Bedingungen spezifisch hybridisieren kann und

20

wobei ein den ersten (t1) mit dem zweiten Teilabschnitt (t2) verbindender für den zweiten Teilabschnitt (t2) spezifischer Zwischenabschnitt z oder ein den dritten (t3) mit dem vierten Teilabschnitt (t4) verbindender für den vierten Teilabschnitt (t4) spezifischer Zwischenabschnitt z vorgesehen ist,

30

b) Inkontaktbringen der Nukleinsäure S oder der dazu komplementären Nukleinsäure S' mit dem ersten Primerpaar in einer Lösung und Durchführen einer ersten Primerverlängerungsreaktion, bei welcher der erste Primer (P1) unter den ersten Bedingungen oder der zweite Primer (P2) unter den zweiten Be-

35

dingungen zumindest einmal mindestens so weit verlängert wird, dass der jeweils andere Primer (P2, P1) des ersten Primerpaars unter den für dessen spezifisches Hybridisieren erforderlichen ersten oder zweiten Bedingungen an ein dabei gebildetes erstes Primerverlängerungsprodukt spezifisch binden kann,

c) Durchführen einer zweiten Primerverlängerungsreaktion, bei welcher das erste Primerverlängerungsprodukt als Matrize dient und der zweite (P2) oder erste Primer (P1) unter den für dessen spezifisches Hybridisieren mit dem ersten Primerverlängerungsprodukt erforderlichen ersten oder zweiten Bedingungen unter Bildung eines zweiten Primerverlängerungsprodukts verlängert wird,

d) Bereitstellen eines zusammen mit dem zweiten Primerverlängerungsprodukt zur Durchführung einer PCR geeigneten zweiten Primerpaars mit einem dritten (P3) und einem vierten Primer (P4),

wobei die Sequenzen des dritten (P3) und vierten Primers (P4) so gewählt sind, dass der dritte Primer (P3) mit einer zum ersten Teilabschnitt (t1) komplementären Sequenz und der vierte Primer (P4) mit einer zum dritten Teilabschnitt (t3) komplementären Sequenz unter definierten dritten Bedingungen spezifisch hybridisieren kann,

e) Inkontaktbringen des zweiten Primerverlängerungsprodukts mit dem zweiten Primerpaar und Durchführen einer PCR, wobei unter Bildung dritter Primerverlängerungsprodukte der Zwischenabschnitt z oder ein dazu komplementärer Zwischenabschnitt z' amplifiziert wird,

f) Bereitstellen einer immobilisierten Sonde (So), welche mit dem Zwischenabschnitt z oder dem dazu komplementären Zwi-

schenabschnitt z' unter definierten vierten Bedingungen spezifisch hybridisieren kann,

- g) Inkontaktbringen der Sonde (So) mit den dritten Primer-
 5 verlängerungsprodukten unter den vierten Bedingungen,
- h) Nachweis der an der Sonde (So) bindenden oder gebundenen
 dritten Primerverlängerungsprodukte.

10 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die erste und zweite
 Primerverlängerungsreaktion als PCR durchgeführt werden.

3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
 die erste und/oder zweite Primerverlängerungsreaktion
 15 und/oder PCR unter Heißstartbedingungen durchgeführt wird.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
 die erste und/oder zweite Primerverlängerungsreaktion höch-
 stens 10 mal, vorzugsweise höchstens 5 mal, insbesondere
 20 höchstens 2 mal, durchgeführt wird.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
 die Sequenzen des ersten (t1) und dritten Teilabschnitts (t3)
 so gewählt sind, dass die dritten Bedingungen so stringent
 sein können, dass der zweite Teilabschnitt (t2) mit dem er-
 sten Abschnitt der Nukleinsäure S und der vierte Teilab-
 schnitt (t4) mit dem zweiten Abschnitt der zu der Nukleinsäu-
 re S komplementären Nukleinsäure S' unter den dritten Bedin-
 30 gungen im Wesentlichen nicht hybridisiert.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
 die Sequenzen und Konzentrationen des ersten (P1), zweiten
 (P2), dritten (P3) und vierten Primers (P4) so gewählt sind,
 dass die spezifische Annealingtemperatur des mit der zum er-
 35 sten Teilabschnitt (t1) komplementären Sequenz hybridisieren-

den dritten Primers (P3) und des mit der zum dritten Teilabschnitt (t3) komplementären Sequenz hybridisierenden vierten Primers (P4) jeweils zumindest um 5 °C höher ist als die jeweils höhere Annealingtemperatur des mit dem ersten Abschnitt der Nukleinsäure S hybridisierenden zweiten Teilabschnitts (t2) und des mit dem zweiten Abschnitt der komplementären Nukleinsäure S' hybridisierenden vierten Teilabschnitts (t4).

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei Schritt lit. e in der Lösung durchgeführt wird.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zumindest die Schritte lit. a bis lit. e, insbesondere die Schritte lit. a bis lit. h in einem verschlossenen Gefäß durchgeführt werden, welches zwischen den Schritten nicht geöffnet wird.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Konzentration des den Zwischenabschnitt z enthaltenden ersten oder zweiten Primers (P1, P2) in der Lösung so niedrig gewählt wird, dass durch diesen Primer (P1, P2) ein Hybridisieren der Sonde (So) mit dem Zwischenabschnitt z oder dem dazu komplementären Zwischenabschnitt z' beim Schritt lit. g nicht wesentlich inhibiert wird.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Konzentration des ersten Primerpaars in der Lösung auf 0,001 bis 0,1 $\mu\text{mol/l}$ eingestellt wird.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Verhältnis der Konzentrationen von erstem Primerpaar zu zweitem Primerpaar kleiner als 1:10, vorzugsweise kleiner als 1:100, besonders vorzugsweise kleiner als 1:1000, ist.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das zweite Primerpaar der Lösung vor der ersten Primerverlängerungsreaktion zugesetzt wird.
- 5 13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei beim Schritt lit. e der dritte (p3) oder der vierte Primer (P4) häufiger verlängert wird als der jeweils andere Primer (P4, P3) des zweiten Primerpaars.
- 10 14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei in dem beim Schritt lit. d bereitgestellten zweiten Primerpaar der dritte (P3) oder vierte Primer (P4) gegenüber dem jeweils anderen darin enthaltenen Primer (P4, P3) im Überschuss vorliegt.
- 15 15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Lösung zum Nachweis unterschiedlicher Nukleinsäuren S eine Mehrzahl erster Primerpaare zugesetzt wird, deren erste (P1) oder zweite Primer (P2) sich jeweils im Zwischenabschnitt z und im sich daran anschließend angeordneten zweiten (t2) oder vierten Teilabschnitt (t4) unterscheiden, wobei jeder der zweiten (t2) oder vierten Teilabschnitte (t4) spezifisch für genau eine der Nukleinsäuren S ist.
- 20 16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Lösung zum Nachweis unterschiedlicher Nukleinsäuren S eine Mehrzahl erster Primerpaare zugesetzt wird, deren erste Primer (P1) einen jeweils identischen oder nahezu identischen ersten Teilabschnitt (t1) und/oder deren zweite Primer (P2) einen jeweils identischen oder nahezu identischen dritten Teilabschnitt (t3) aufweisen und deren zweiter (t2) oder vierter Teilabschnitt (t4) jeweils spezifisch für genau eine der Nukleinsäuren S ist.
- 30

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die ersten (t1) und dritten Teilabschnitte (t3) identisch oder nahezu identisch sind und der dritte Primer (P3) identisch mit dem vierten Primer (P4) ist.

5

18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Sequenzen der ersten (P1), zweiten (P2), dritten (P3) und vierten Primer (P4) so gewählt sind, dass sie bei dem Verfahren keine Primer-Dimere bilden und/oder nicht mit sich selbst oder untereinander hybridisieren.

10

19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Sequenzen der Zwischenabschnitte z so gewählt sind, dass sie weder selbst noch die dazu komplementären Zwischenabschnitte z' bei dem Verfahren mit sich selbst oder mit den ersten (t1), zweiten (t2), dritten (t3) oder vierten Teilabschnitten (t4) oder deren komplementären Sequenzen hybridisieren.

15

20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zum spezifischen Nachweis der eine erste Base aufweisenden Nukleinsäure S in Gegenwart einer sich von der Nukleinsäure S nur in der ersten Base unterscheidenden weiteren Nukleinsäure die Sequenzen der ersten (P1) oder zweiten Primer (P2) so gewählt sind, dass sich die jeweilige Base des zweiten (t2) oder vierten Teilabschnitts (t4), die zu der ersten Base oder einer dazu komplementären zweiten Base einer komplementären Nukleinsäure S' komplementär ist, am 3'-Ende oder in der Nähe des 3'-Endes des ersten (P1) oder zweiten Primers (P2) befindet.

20

25

30

21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei die zweiten (t2) oder vierten Teilabschnitte (t4) eine Base enthalten, welche nicht zu einer ihr in der Position entsprechenden dritten Base im

ersten Abschnitt der Nukleinsäure S oder im zweiten Abschnitt der Nukleinsäure S' komplementär ist.

22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
5 zum Nachweis unterschiedlicher Nukleinsäuren S die jeweiligen
Sequenzen der ersten (P1), zweiten (P2), dritten (P3) und
vierten Primer (P4) und der Sonde (So) so gewählt sind, dass
jeweils die ersten, jeweils die zweiten, jeweils die dritten
und/oder jeweils die vierten Bedingungen für den Nachweis der
10 unterschiedlichen Nukleinsäuren S identisch sind.
23. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
die Sonde (So) an einer Elektrode (E) oder in deren unmittel-
barer Nähe immobilisiert ist.
15
24. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
der Nachweis beim Schritt lit. h durch Erfassen einer Ände-
rung einer fluoreszenzoptischen Eigenschaft oder einer durch
das Hybridisieren bedingten Änderung einer elektrischen Ei-
20 genschaft an der Elektrode (E) erfolgt.
25. Verfahren nach Anspruch 24, wobei als Änderung der elek-
trischen Eigenschaft eine Änderung einer Redox-Eigenschaft,
insbesondere bei der Oxidation von Guanin- oder Adenin-Resten
des dritten Primerverlängerungsprodukts, einer Impedanz oder
einer Leitfähigkeit über die Elektrode (E) gemessen wird.
26. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
der dritte (P3) und/oder der vierte Primer (P4) einen, insbe-
30 sondere fluoreszenzoptisch oder mittels der Elektrode (E)
elektrisch oder elektrochemisch nachweisbaren, vorzugsweise
redoxaktiven, Marker aufweist.
27. Verfahren nach Anspruch 26, wobei der Marker ein spezi-
35 fisches Affinitätsmolekül, einen Osmium-Komplex, ein Nano-

gold-Partikel, eine Cystein-, Ferrocenyl-, Daunomyzin-, Benzochinon-, Naphthochinon-, Anthrachinon- oder p-Aminophenol-Gruppe, einen Farbstoff, insbesondere Indophenol, Thiazin oder Phenazin, oder einen Fluoreszenzfarbstoff, insbesondere 6-FAM, HEX, TET, Cy3, Cy5, IRDye™700, IRDye™800, Biodipy, Fluorescein, Joe, Rox, TAMRA oder Texas Red, aufweist.

10 28. Verfahren nach Anspruch 26, wobei der Marker ein Enzym ist, welches ein Substrat so umsetzen kann, dass das Reaktionsprodukt elektrochemisch oder optisch spezifisch nachgewiesen werden kann.

15 29. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zum Nachweis unterschiedlicher Nukleinsäuren S eine Vielzahl unterschiedlicher zu den Zwischenabschnitten z oder den dazu komplementären Zwischenabschnitten z' komplementärer Sonden (So) verwendet wird, von denen jede an oder in unmittelbarer Nähe einer separaten Elektrode (E) gebunden ist.

20 30. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zum Nachweis unterschiedlicher Nukleinsäuren S eine Vielzahl einzeln kontaktierter oder kontaktierbarer auf einer Oberfläche, insbesondere einem Elektrodenchip, angeordneter Elektroden (E) verwendet wird.

30 31. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei eine RNA indirekt nachgewiesen wird, indem sie in eine DNA umgeschrieben und die DNA dann als Nukleinsäure S nachgewiesen wird.

32. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche zum parallelen Nachweis einer Mehrzahl unterschiedlicher Nukleinsäuren S enthaltend:

a) für jede nachzuweisende Nukleinsäure S je ein zusammen mit der Nukleinsäure S zur Durchführung einer PCR geeignetes erstes Primerpaar mit einem ersten (P1) und einem zweiten Primer (P2),

5

wobei der erste Primer (P1) einen 5'-endständigen ersten Teilabschnitt (t1) sowie einen 3'-endständigen zweiten Teilabschnitt (t2) und der zweite Primer (P2) einen 5'-endständigen dritten Teilabschnitt (t3) und einen 3'-endständigen vierten Teilabschnitt (t4) aufweist,

10

wobei die Sequenzen des zweiten (t2) und des vierten Teilabschnitts (t4) so ausgewählt sind, dass der zweite Teilabschnitt (t2) mit einem vorgegebenen ersten Abschnitt der jeweils nachzuweisenden Nukleinsäure S unter definierten ersten Bedingungen und der vierte Teilabschnitt (t4) mit einem vorgegebenen zweiten Abschnitt einer zu der jeweils nachzuweisenden Nukleinsäure S komplementären Nukleinsäure S' unter definierten zweiten Bedingungen spezifisch hybridisieren kann und

15

20

wobei ein den ersten (t1) mit dem zweiten Teilabschnitt (t2) verbindender für den zweiten Teilabschnitt (t2) spezifischer Zwischenabschnitt z oder ein den dritten (t3) mit dem vierten Teilabschnitt (t4) verbindender für den vierten Teilabschnitt (t4) spezifischer Zwischenabschnitt z vorgesehen ist und

b) für jede nachzuweisende Nukleinsäure S je ein zweites Primerpaar mit einem dritten (P3) und einem vierten Primer (P4), welches zusammen mit einem bei Anwesenheit der jeweils nachzuweisenden Nukleinsäure S mittels des ersten (P1) und zweiten Primers (P2) erzeugbaren Primerverlängerungsprodukt zur Durchführung einer PCR geeignet ist und

30

wobei die Sequenzen des dritten (P3) und vierten Primers (P4) so gewählt sind, dass der dritte Primer (P3) mit einer zu den ersten Teilabschnitten (t1) der ersten Primer komplementären Sequenz und der vierte Primer (P4) mit einer zu den dritten Teilabschnitten (t3) der zweiten Primer komplementären Sequenz unter definierten dritten Bedingungen spezifisch hybridisieren kann.

33. Kit nach Anspruch 32, wobei darin für jede nachzuweisende Nukleinsäure S je eine Sonde (So) enthalten ist, welche jeweils mit dem Zwischenabschnitt z oder dem dazu komplementären Zwischenabschnitt z' unter definierten vierten Bedingungen spezifisch hybridisieren kann.

34. Kit nach Anspruch 33, wobei die Sonden (So) immobilisiert sind.

35. Kit nach einem der Ansprüche 32 bis 34, wobei die ersten Teilabschnitte (t1) der in dem Kit enthaltenen ersten Primer (P1) gleich sind und/oder die dritten Teilabschnitte (t3) der in dem Kit enthaltenen zweiten Primer (P2) gleich sind.

36. Kit nach einem der Ansprüche 32 bis 35, wobei die Sequenzen der Zwischenabschnitte z so gewählt sind, dass die vierten Bedingungen für alle Zwischenabschnitte z oder die dazu komplementären Zwischenabschnitte z' identisch sind.

37. Kit nach einem der Ansprüche 32 bis 36, wobei eine Anordnung von Elektroden (E) enthalten ist, wobei an oder in unmittelbarer Nähe jeder Elektrode (E) der Anordnung jeweils eine Sonde (So) immobilisiert ist.

38. Kit nach Anspruch 37, wobei die Anordnung von Elektroden (E) ein Elektrodenchip ist.

39. Kit nach einem der Ansprüche 32 bis 38, wobei statt des ersten Primerpaars Angaben der Sequenzen des ersten Teilabschnitts (t1), des dritten Teilabschnitts (t3) und des Zwischenabschnitts z oder der dazu jeweils komplementären Sequenzen enthalten sind.
- 5

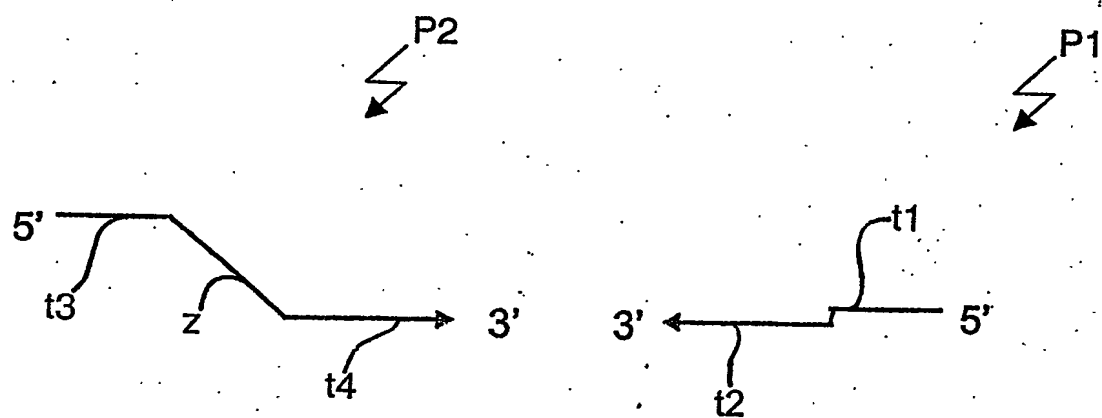


Fig. 1

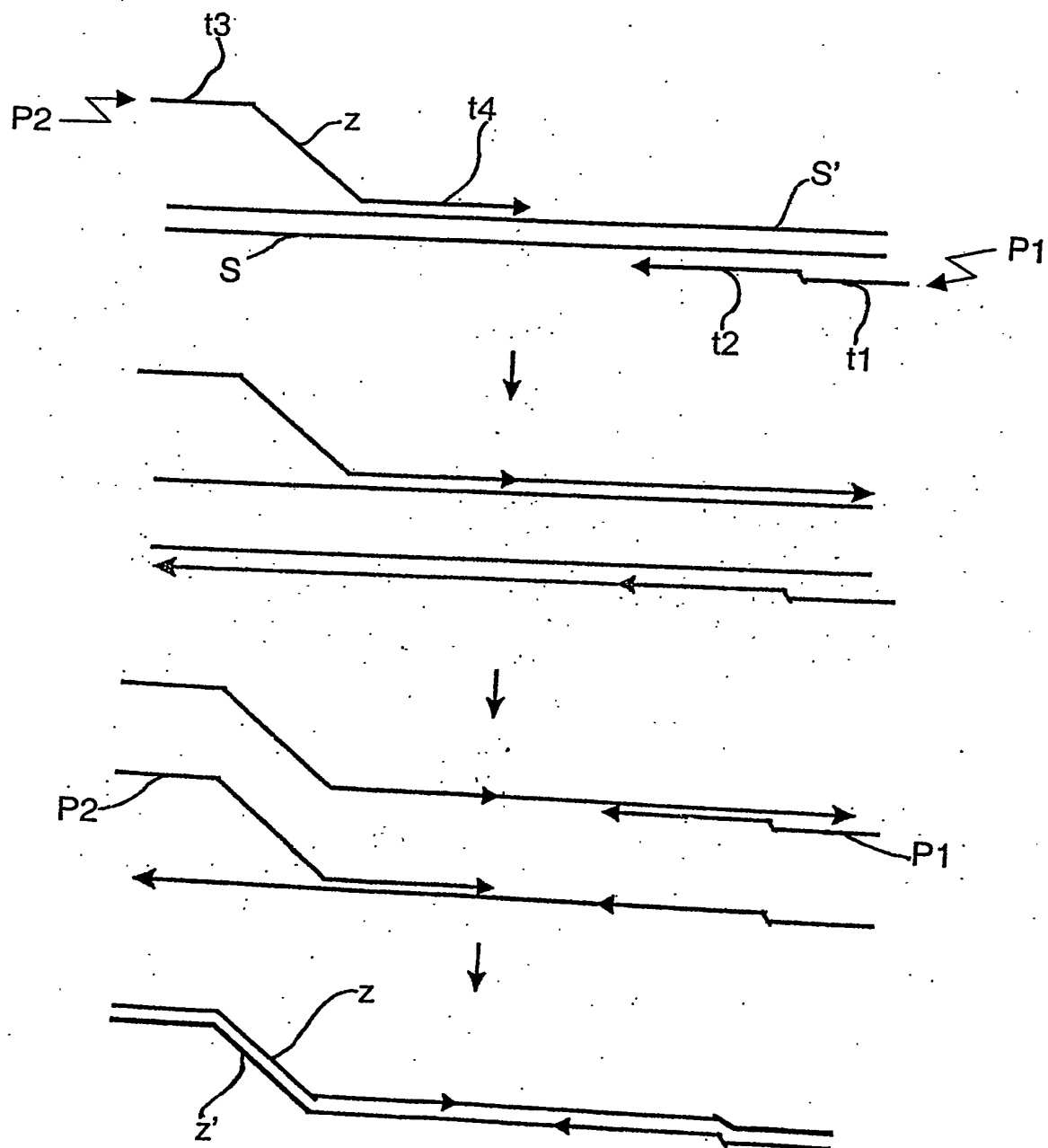


Fig. 2

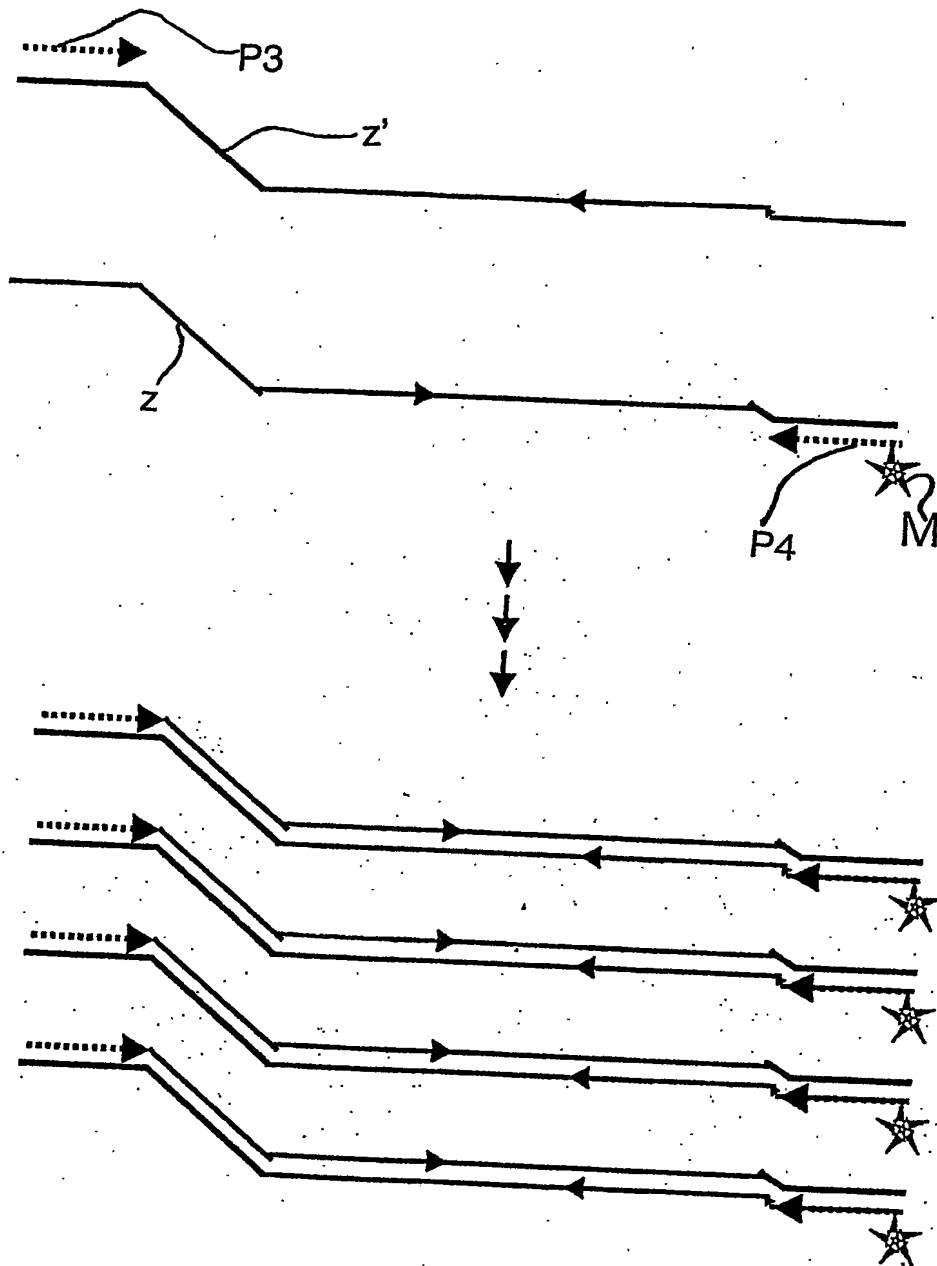


Fig. 3

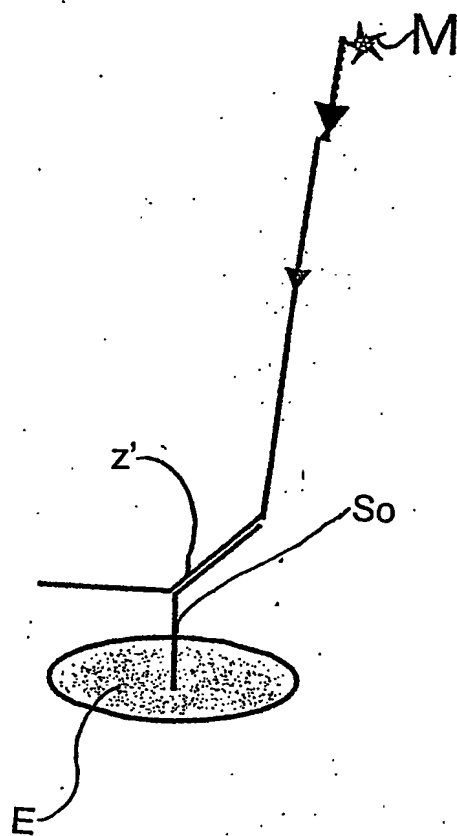


Fig. 4

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis mindestens einer Nukleinsäure S. Beim Vorhandensein der Nukleinsäure S werden Primer verlängert, welche einen Zwischenabschnitt z aufweisen. Der Zwischenabschnitt z wird mittels eines zweiten Primerpaares spezifisch amplifiziert und durch Hybridisierung mit einer Sonde So spezifisch nachgewiesen.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.